

大鼠短间隔连续部分肝切除中再生肝的基因表达差异

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 李文强, 杨柯金, 赵利峰, 李玉昌, 张会勇, Salman Rahman, 章静波

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 杨柯金, 赵利峰, 河南师范大学生命科学学院 河南省新乡市 453002
李文强, 李玉昌, 张会勇, 章静波, 细胞分化调控国家重点实验室培育基地 河南省新乡市 453002
Salman Rahman, 伦敦大学血友病研究中心 英国伦敦市 SE17EH
徐存拴, 男, 1958-02-02 生, 河南省林州市人, 汉族. 1995 年德国 Bremen 大学博士毕业, 教授. 主要从事细胞分化和去分化机制研究.
国家自然科学基金, No. 30270673
国家重点实验室基金资助项目, No. 030001
项目负责人: 徐存拴, 453002, 河南省新乡市建设路 148 号, 河南师范大学生命科学学院. xucs@x263.com.cn
电话: 0373-3326001/3326609 传真: 0373-3326524
收稿日期: 2003-10-28 接受日期: 2003-12-08

Gene expression difference in regenerating rat liver after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy

Cun-Shuan Xu, Hong-Peng Han, Jin-Yun Yuan, Cui-Fang Chang, Wen-Qiang Li, Ke-Jing Yang, Li-Feng Zhao, Yu-Chang Li, Hui-Yong Zhang, Salman Rahman, Jing-Bo Zhang

Cun-Shuan Xu, Hong-Peng Han, Jin-Yun Yuan, Cui-Fang Chang, Ke-Jing Yang, Li-Feng Zhao, College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian 453002, China
Wen-Qiang Li, Yu-Chang Li, Hui-Yong Zhang, Jing-Bo Zhang, State Key Laboratory of the Cell Differentiation and Regulation Built by Province and Ministry, Xinxian 453002, China
Salman Rahman, Haemophilia Research Center, London SE17EH, U.K
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30270673 and National Key Laboratory, No. 030001
Correspondence to: Dr. Cun-Shuan Xu, College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian, 453002, Henan Province, China.
xucs@x263.net.cn
Received: 2003-10-28 Accepted: 2003-12-08

Abstract

AIM: To identify genes related to rat liver regeneration (LR) after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy (SISPH) and to analyze their action and expression profile in LR.

METHODS: A cDNA microarray containing 551 elements (liver chip) was made to analyze extensively expression changes of them in 0-36-40-44h SISPH, which were selected from subtractive cDNA libraries of the LR. Cluster analysis of these gene expression profile was performed by Genemath.

RESULTS: Among the selected 551 cDNA, 157 were up- or down-regulated more than twofold at one or more time points. Of the 157 elements, 86 were up-regulated and 71 down-regulated, and 70 were unreported and 87 were reported, which had not been previously reported to be involved in LR. By cluster analysis and generalization analysis, 6 distinct temporal induction or suppression patterns showed that immediate induction, intermediate

induction, late induction, immediate suppression, intermediate suppression, and late suppression. Comparison of the gene expression in SISPH with after PH found that 38 genes were specially altered in SISPH, and the expression trends for other 119 genes were similar between SISPH and PH, except of the various abundance at the different time points.

CONCLUSION: In 0-36-40-44h SISPH, the numbers of the up-regulated and down-regulated genes show no apparent difference. The genes expressed lately are more than that immediately, and much more than that intermediately. The genes expressed abundantly are much less than that increased 2-5 folds.

Xu CS, Han HP, Yuan JY, Chang CF, Li WQ, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB. Gene expression difference in regenerating rat liver after 0-36-40-44h short interval successive partial hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):654-663

摘要

目的: 鉴定 0-36-40-44 h 大鼠短间隔连续部分肝切除(0-36-40-44 h SISPH)中与肝再生有关的基因, 并分析他们在肝再生中的表达动态和作用.

方法: 从 0-36-40-44h SISPH 再生肝消减 cDNA 文库中筛选与肝再生有关的基因, 用基因芯片技术分析其在肝再生中的表达动态, 并用 GeneMath 软件对有关基因进行聚类分析.

结果: 用基因芯片技术分析的 551 个与肝再生有关基因中, 157 个基因至少在肝再生的一个时间点表达变化达 2 倍以上, 其中, 上调表达的基因有 87 个, 下调表达的基因有 70 个; 157 个基因中的 71 个属未报道的基因, 86 个为已报道基因, 但在此之前尚不清楚他们与肝再生有关; 聚类分析和统计学分析表明, 0-36-40-44 h SISPH 的基因表达模式分为 6 类, 即早期诱导, 中期诱导, 晚期诱导, 早期抑制, 中期抑制, 晚期抑制. 与 PH 相比, 38 个基因在 0-36-40-44 h SISPH 中特异性表达, 119 个基因在这两个模型中表达趋势相同, 但在各时间点的表达丰度不同.

结论: 0-36-40-44 h SISPH 中, 上调和下调表达的基因数目相差不大; 晚期表达的基因多于早期表达的基因, 远多于中期表达的基因; 表达幅度小的基因(2-5 倍)多于表达幅度大的基因.

徐存拴, 韩鸿鹏, 袁金云, 常翠芳, 李文强, 杨柯金, 赵利峰, 李玉昌, 张会勇, Salman Rahman, 章静波. 大鼠短间隔连续部分肝切除中再生肝的基因表达差异. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):654-663

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/654.asp>

0 引言

肝脏再生能力极强, 部分切除后, 残肝代偿性增生, 恢复丢失的肝量^[1]. 肝再生是一个受到精细调控的过程^[2-3], 所以, 肝再生的研究已成为热点^[4-24]. 但是, 到目前为止, 人们尚不完全清楚所有与肝再生有关的基因, 更不清楚肝再生的确切分子机制^[25-27]. 为此, 我们以肝再生中的细胞活动特点为依据, 选择肝再生的细胞分裂启动阶段(部分肝切除后4 h)和细胞分裂高峰时间(部分肝切除后36 h)及两个时点的相互交叉时点进行连续部分肝切除, 建立了短间隔连续部分肝切除模型(short interval successive partial hepatectomy, SISPH)^[28-29], 并用抑制性消减杂交技术与基因表达谱芯片分析技术相结合的方法分析了0-36-40-44 h SISPH的再生肝中基因表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 SD纯系大鼠由河南师范大学实验动物中心提供, 雌雄各半, 10-12周龄, 体重200-250 g, 按徐存拴 et al 方法^[29-30]建立的0-36-40-44 h短间隔连续部分肝切除(0-36-40-44 h SISPH)模型进行大鼠部分肝切除, 即第一次切除大鼠肝的左外叶(0 h), 恢复36 h切除大鼠肝的左中叶和中叶(36 h), 再恢复4 h后切除大鼠肝的右叶(40 h), 又恢复4 h后切除大鼠肝的尾状叶(44 h), 收集各次切下的肝叶备用.

1.2 方法 用预冷的1 × PBS冲洗切除的肝叶, 然后放入-80℃冰箱用于提取RNA和蛋白质. 总RNA提取按Trizol kit (invitrogen)进行. 首先用含苯酚和异硫氰酸胍(阳离子去垢剂)的变性剂溶解RNA, 然后用苯酚-氯仿-异戊醇纯化沉淀. 用EB染色的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 用紫外分光光度计测定RNA浓度. 然后, 按Clontech公司的PCR-Select™ cDNA Subtraction kit构建消减文库, 测定阳性克隆的核酸序列(EST), 并通过NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) GeneBank数据库查找ESTs相应的基因.

1.2.1 基因芯片制作 以筛选的阳性克隆核酸序列(EST)为模板, 用Nested PCR Primer1和Primer2进行PCR扩增, 产物用醋酸铵/异丙醇纯化法进行纯化, 用EB染色的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物纯度. 借助ProSys-5510A点样仪和SMP3将PCR产物点到基片上, 于点样仪中水合30 min, 室温干燥2 h, 以封闭液封闭15 min, 水冲洗、室温干燥后备用. 共计1 152个点(片内重复), 其中控制系统50个(包括阴性对照8个; 空白对照12个; 内参基因30个), 待研究的基因551个; 分为8个亚矩阵, 每个亚矩阵中有12 × 12个点, 点样面积为9 mm × 18 mm. 点间距为0.375 mm. 芯片经脱水, 封闭, 干燥备用.

1.2.2 cDNA探针荧光标记和杂交、扫描 以正常肝脏为对照, 以变性的RNA为模板, 用MMLV反转录酶(Promega公司提供), 含有Cy3-dCTP(对照组)和Cy5-dCTP(实验组)的dNTP (amersham-pharmacia biotech公司提供)和oligo (dT)引物系统进行反转录. 42℃孵育2 h,

加入标记缓冲液I和II, 然后将对照组和实验组合并, 充分混匀后在含有新鲜变性鲑鱼精子DNA的预杂交液中42℃预杂交5-6 h, 再加入标记过的变性探针, 42℃杂交过夜(16-18 h), 再用含5 g/L SDS的2 × SSC室温洗片2次(5 min/次), 含5 g/L SDS的0.2 × SSC在60℃洗片1次(10 min). 用GenePix4000A荧光激光扫描系统(axon instruments, Inc., foster city, CA)对芯片照片进行扫描, 每个时间点均做2次杂交, 最终得到半定量的杂交结果: 绿色信号(下调); 黄色信号(变化不显著); 红色信号(上调). 通过GenePix Pro 3.0软件将cy3和cy5荧光标记按信号强弱进行定量, 用经典的直线回归技术, 将得到的数字资料作标准化处理. 先将所有数据的前景值与背景值相减, 得出cy3, cy5标记的强度值; 将cy5小于200的强度值以200取代. 计算总数为 n 的有效基因(cy3, cy5值二者皆大于200或其一大于800, $R_i = \text{cy5}/\text{cy3}$ 在0.1-10之间的 $R_i = \text{cy5}/\text{cy3}$ 的自然对数值 $R_i' = \ln(R_i)$), 均一化系数 $ND = \text{EXP}(R_i')$. 将所有数据项的cy3标记强度乘上Normalize系数, 得出调整后的cy3*. 将所有cy3*小于200的强度值以200取代, 算出所有调整后的Ratio值($\text{cy5}/\text{cy3}^*$). 筛选出Ratio大于2或小于0.5的元素进行数据分析, 他们分别代表不同的基因在一个时间点以上表达变化2倍以上. 用GeneMath, GeneSpring (silicon genetics, san carlos, CA), Microsoft Excel (microsoft, redmond, WA)数据分析软件对各组数据进行聚类和分析. 将筛选的ESTs序列递交NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) GeneBank数据库, 进行同源和相似性检索, 借助于大鼠基因组图谱(RGD), 用电子克隆方法进行基因的染色体定位和查找ESTs相应的cDNA全长.

2 结果

2.1 SISPH中与肝再生有关基因的种类 点于芯片上的551个待检测的基因中, 157个基因在0-36-40-44 h SISPH中表达变化显著(变化倍数达2倍以上), 其中, 87个为上调表达, 70个为下调表达. 71为未报道的基因, 86为已报道的基因, 可按功能把这86个基因分为20类, 即参与应急反应的蛋白, 参与糖类代谢的酶, 参与脂肪或类固醇代谢的酶, 参与氧化还原反应的蛋白, 参与生物调节的蛋白, 糖蛋白, 脂蛋白, 核蛋白, 各种因子, 免疫蛋白, 细胞骨架蛋白, 标记蛋白, 受体蛋白, 参与氨基酸代谢的酶, 蛋白水解酶, 蛋白水解酶抑制因子, 磷酸化酶, 磷酸酶, 合成酶, 转移酶等(表1).

2.2 SISPH中与肝再生相关基因的聚类分析 从36 h到44 h, 基因表达谱一直是分散的, 说明与肝再生相关的基因表达一直十分活跃(图1A), 用GeneSpring软件对0-36-40-44 h SISPH的4个时间点差异表达基因进行等级聚类分析表明, 各时间点的基因表达轮廓没有相似性(图1B). 为了更好地解释和说明这些数据, 用

GeneMath 进行均一化分析表明, 这些基因可分为 8 个不同的分支聚类(图2). 对基因表达变化达到最大的时间点

进行聚类分析表明, SISPH 中存在 6 个典型的基因表达模式, 即早期诱导, 中期诱导, 晚期诱导, 早期抑

表 1 SISPH 中与肝再生相关的基因及变化(* SISPH 中特异性表达的基因)

编号	名称	差异值	编号	名称	差异值
未报道的基因					
1	AW558171	0.3	89	细胞色素 P450 3A1 (PNCN inducible, Cyp3A1)	0.3
2	CG31759-PA	2.2	90	细胞色素 P450 2E1	0.2
*3	CH230-11N5	2.4	91	细胞色素 P450 花生四烯酸环氧酶 (Cyp 2C23)	0.3
4	CH230-186B23	0.3	92	细胞色素 P450, 2c39 (Cyp2c39)	0.5
5	CH230-206C20	0.4	*93	细胞色素 P450, 2b19 (Cyp2b15)	0.4
6	CH230-329D3	2.8	94	黄素单加氧酶 1 (Fmo1)	0.2
7	CH230-372C24	0.3	95	对氧酶 1 (Pon1)	0.4
8	CH230-7A22	0.3	96	过氧化物酶体肌氨酸氧化酶 (PSO)	0.4
9	Citb585c7	0.3	*97	核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶	0.4
*10	CTD-2328C19	2.5	参与生物调节的蛋白		
11	FLJ20356	2.5	98	含 34 肽重复序列的蛋白 II	0.5
12	LOC119392	2.3	*99	RAKb	0.3
*13	LOC311304	2.0	糖蛋白		
14	LRRP Aa2-020	0.5	100	α -1-B 糖蛋白 (A1bg)	0.2
15	LRRP Ab1-021	3.0	101	纤维蛋白原 γ (Fgg)	6.9
16	LRRP Aa2-028	2.6	102	纤连蛋白 1 (Fn1)	2.4
*17	LRRP Aa2-111	0.5	103	富含组氨酸的糖蛋白 (Hrg)	0.4
18	LRRP Aa2-174	0.2	104	鞘磷脂相关的糖蛋白 (L-MAG)	5.1
19	LRRP Aa2-296	3.1	105	UDP-葡萄糖醛基粘蛋白	0.4
20	LRRP Ab1-114	3.0	脂蛋白		
*21	LRRP Ab1-119	2.1	106	载脂蛋白 C-1 (ApoC1)	0.4
22	LRRP Ab1-216	5.2	107	可溶性载体家族 20, 成员 1 (Slc20a1)	0.4
23	LRRP Ab1-331	3.0	108	TNF α -诱导的脂肪相关蛋白	2.4
24	LRRP Ab1-334	2.8	*109	甲状腺素运载蛋白 (TTN)	0.3
25	LRRP Ab2-008	2.0	核蛋白		
*26	LRRP Ab2-018	2.0	110	RNA 酶 A 家族 4	0.4
27	LRRP Ab2-034	3.0	各种因子		
*28	LRRP Ab2-079	2.0	111	血管生成素	0.4
*29	LRRP Ab2-093	2.1	112	真核生物翻译起始因子 4A1	2.5
30	LRRP Ab2-095	2.3	113	B 细胞前体集落增强因子 (Pbaf)	3.3
*31	LRRP Ab2-131	0.4	与免疫有关的蛋白		
32	LRRP Ab2-225	0.4	114	补体成分 5 (C5)	11.8
33	LRRP Ab2-232	0.4	115	免疫球蛋白 C- κ	0.4
*34	LRRP Ab2-255	0.4	116	巨噬细胞趋化因子 1 (JE/MCP-1)	3.3
35	LRRP Ab2-371	0.3	*117	免疫球蛋白恒定区 III γ 受体	4.8
36	LRRP Ab2-379	2.2	细胞骨架蛋白		
*37	LRRP Ab2-390	2.1	118	肌动蛋白 γ	2.6
*38	LRRP Ab2-416	0.5	119	网纹蛋白重链 (Hc)	2.0
39	LRRP Ab2-417	0.4	*120	突变型肌动蛋白 β (beta-actin)	2.0
40	LRRP Ac1177	3.6	标记蛋白		
41	LRRP Ac1233	2.1	*121	CD44 抗原 (Cd44)	2.2
42	LRRP Ac1873	5.4	122	血浆淀粉样蛋白 a-5	84.8
43	LRRP Ac2-019	4.1	123	抑制性亚染色体转移片段 4	0.5
44	LRRP Ac2-061	7.4	受体蛋白		
45	LRRP Ac2-143	3.1	*124	可可蛋白	2.3
46	LRRP Ac2-193	2.1	125	ATP 结合框亚家族 C	0.2
47	LRRP Ac2-223	2.1	126	细胞核受体超家族 0, 成员 2 (Nr0b2)	0.4
48	LRRP Ba1-647	4.9	127	I 型白介素 1 受体 (Il1r1)	4.6
49	LRRP Bm403207	7.7	参与氨基酸代谢的酶		
50	LRRP Cb1-739	2.4	128	精氨酸酶 1 (Arg1)	2.6
51	LRRP Cc1-27	0.3	129	精氨酸琥珀酸裂解酶 (Asl)	2.9
52	LRRP Cc1-38	0.2	*130	天冬氨酸转氨酶	3.9
53	LRRP Cc1-9	4.4	*131	苯丙氨酸羟化酶 (Pah)	0.5
*54	LRRP Da1-10	2.1	132	2-酪氨酸辅酶 A 裂解酶 (Hpci2)	0.4
*55	LRRP Da2-4	2.3	蛋白水解酶		
56	LRRP zbs559	2.0	*133	α/β 羟化酶 1	2.7
57	LRRPAb2-132	0.3	134	半胱氨酸蛋白酶 1 (Casp1)	2.4
*58	MGC38937	2.0	蛋白酶抑制因子		
59	RIKEN 1110061A24	2.0	135	α -2-巨球蛋白 (A2m)	7.3
60	RIKEN 1300002A08	0.3	136	α -胰蛋白酶抑制因子重链 4	0.3
*61	RIKEN 1500012D08	2.2	137	依赖 Ca^{2+} 的蛋白水解酶抑制因子	8.3
62	RP11-281N10	0.5	138	丝氨酸蛋白酶抑制因子 1	3.7
63	RP23-195K1	2.7	磷酸化酶		
64	RP23-235O1	0.5	*139	CDK103	2.5
65	RP23-417P22	0.5	140	胸苷酸激酶	2.8
66	RP23-92K11	2.4	141	促黏液蛋白 4	3.6
*67	RP24-176A1	2.4	*142	嘌呤核苷酸磷酸化酶	0.5
68	RP32-28p17	0.3	磷酸酶		
69	DNA segment of Chr 1	4.8	*143	焦磷酸酶 1 (Enpp1)	4.2
70	Adult male mouse liver cDNA	0.2	144	磷脂酰丝氨酸酯酶 A1	2.9
*71	12 days embryo like cDNA	2.2	*145	磷酸酶 1 (GL-subunit)	0.2
参与应急反应的蛋白			*146	分泌型磷酸酶 1 (Spp1)	2.2
72	α 主要急性蛋白	9.8	147	UTP-葡萄糖-1-磷酸酶	0.5
73	血管紧张素原 (Agt)	6.6	合成酶		
*74	C-反应蛋白	2.0	148	谷氨酰脯氨酰-tRNA 合成酶 (Eprs)	3.1
75	激肽原	4.9	149	脂肪酰基化酶 1 (rELO1)	0.2
76	Petaxin	2.1	*150	泛素连接酶 E2N (Ube2n)	2.0
77	T-激肽原 (Kng)	9.6	转移酶		
参与糖代谢的酶			151	谷胱甘肽巯基转移酶 Y(b) 亚基	0.3
78	乙醇脱氢酶 (ADH)	0.4	152	肉毒碱 O-乙酰转移酶 (Crot)	0.3
79	甘油 3-磷酸脱氢酶 (Gpd3)	0.4	153	谷胱甘肽巯基转移酶 α -1 (Gsta1)	0.2
80	异柠檬酸脱氢酶 1 (Idh1)	0.3	154	3 型谷胱甘肽巯基转移酶, (Yb3) (Gstm3)	0.3
*81	3-磷酸甘油酸脱氢酶	17.6	155	巯基转移酶 K2	0.3
参与脂肪或类固醇代谢的酶			156	唾液酸转移酶 1 (Siat1)	0.4
82	丙二酰辅酶 A 脱羧酶	0.5	157	UDP-葡萄糖醛基转移酶 2, 成员 5 (Ugt2b5)	0.4
83	NAD(P) 依赖的脱氢酶	0.3			
84	细胞色素 P450 胆固醇 7- α -羟化酶 (P450 VII)	0.2			
85	前列腺素 D2 合成酶 2 (Ptgds2)	2.0			
86	3- α -羟类固醇脱氢酶	0.2			
参与氧化还原反应的蛋白					
87	细胞色素 b5 (Cyb5)	0.4			
88	细胞色素 P450	0.4			

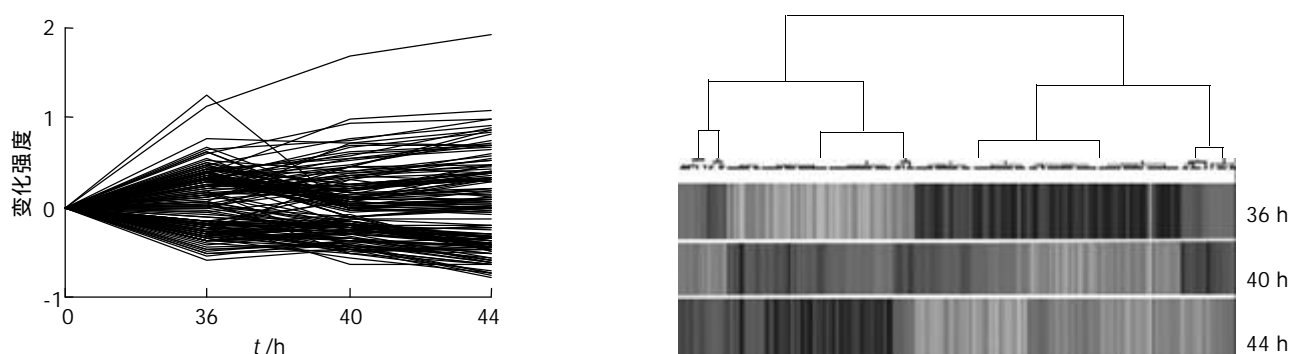


图1 157个基因的聚类分析. A: 至少 SISPH 一个时间点的基因表达变化强度达2倍以上; B: SISPH 各时间点的基因表达轮廓没有相似性.

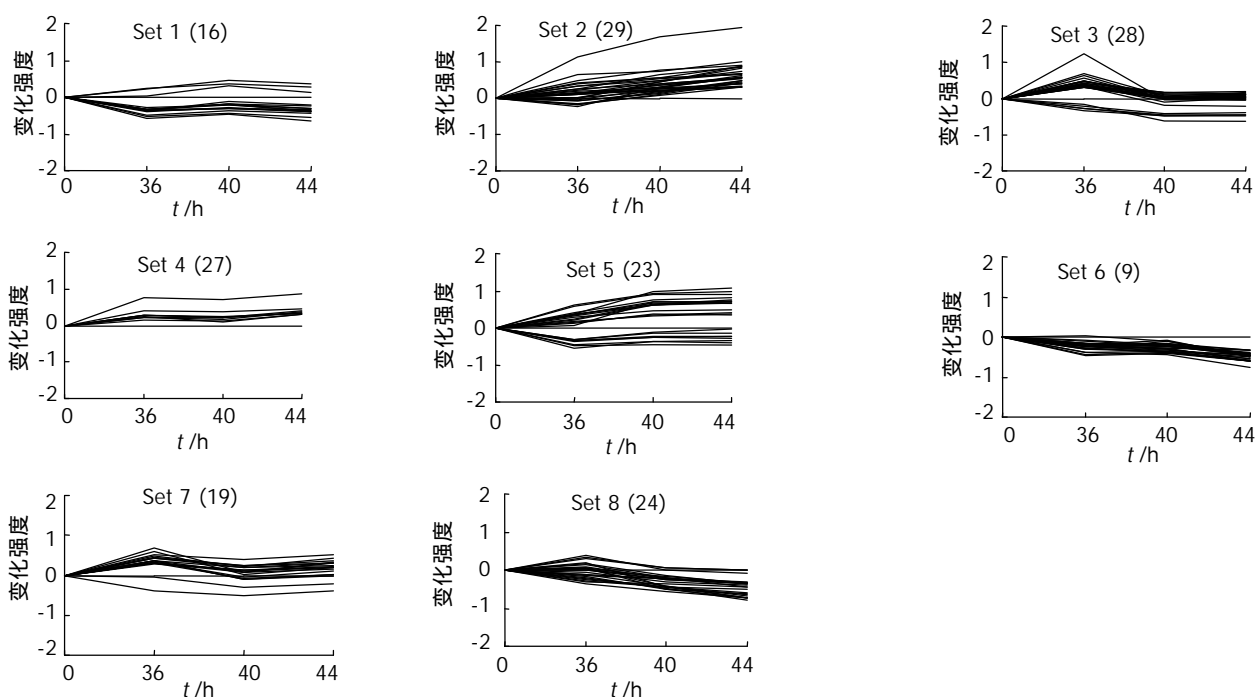


图2 按 GeneMaths 聚类分析方法得到的8类基因表达轮廓.

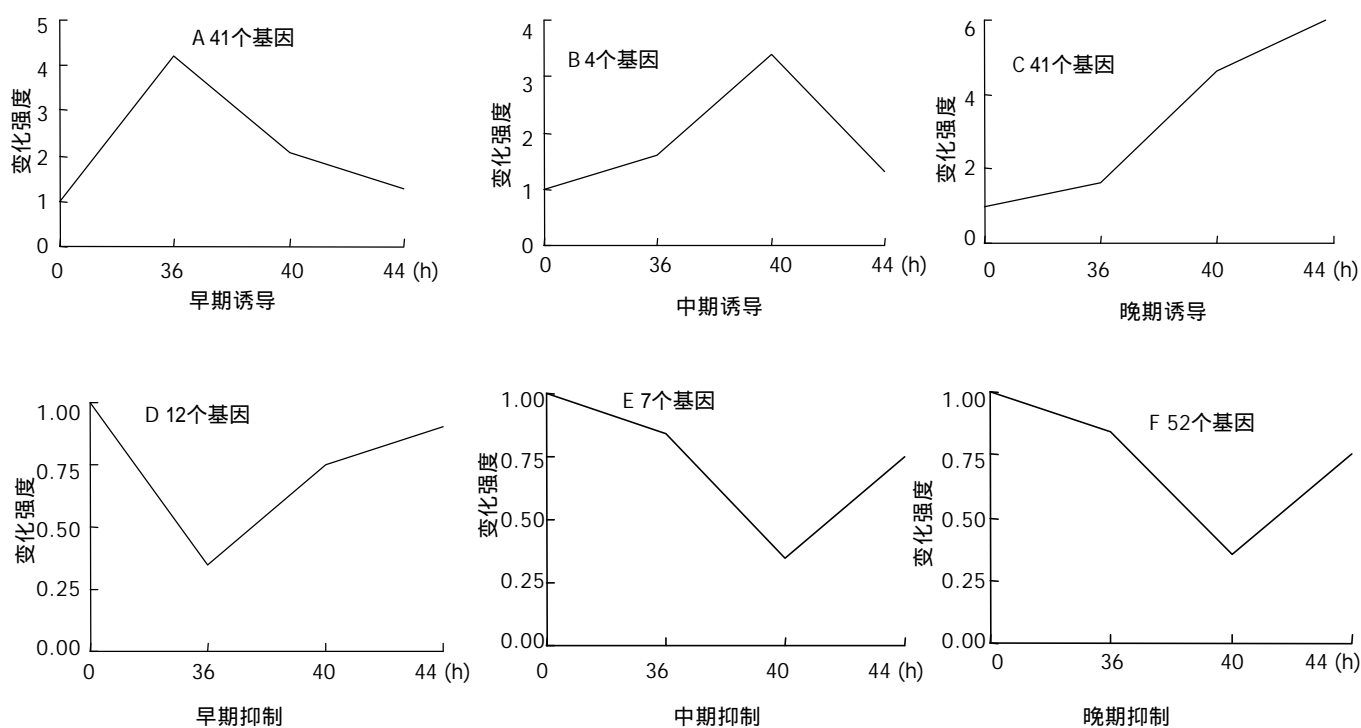


图3 SISPH 不同时间点的基因表达模式.

2.3 SISPH 各时间点表达的基因差异 在0-36-40-44 h SISPH 中, 不同时间点上表达的基因不同, 具体可分为36 h, 36-44 h, 40 h, 40-44 h, 44 h等5类. 在36 h中, 34个基因表达上调, 7个基因表达下调; 在

36-44 h中, 20个基因表达上调, 21个基因表达下调; 40 h中, 2个基因表达上调, 1个基因表达下调; 在40-44 h中, 18个基因表达上调, 14个基因表达下调; 在44 h中, 25个基因表达上调, 15个基因表达下调(图4).

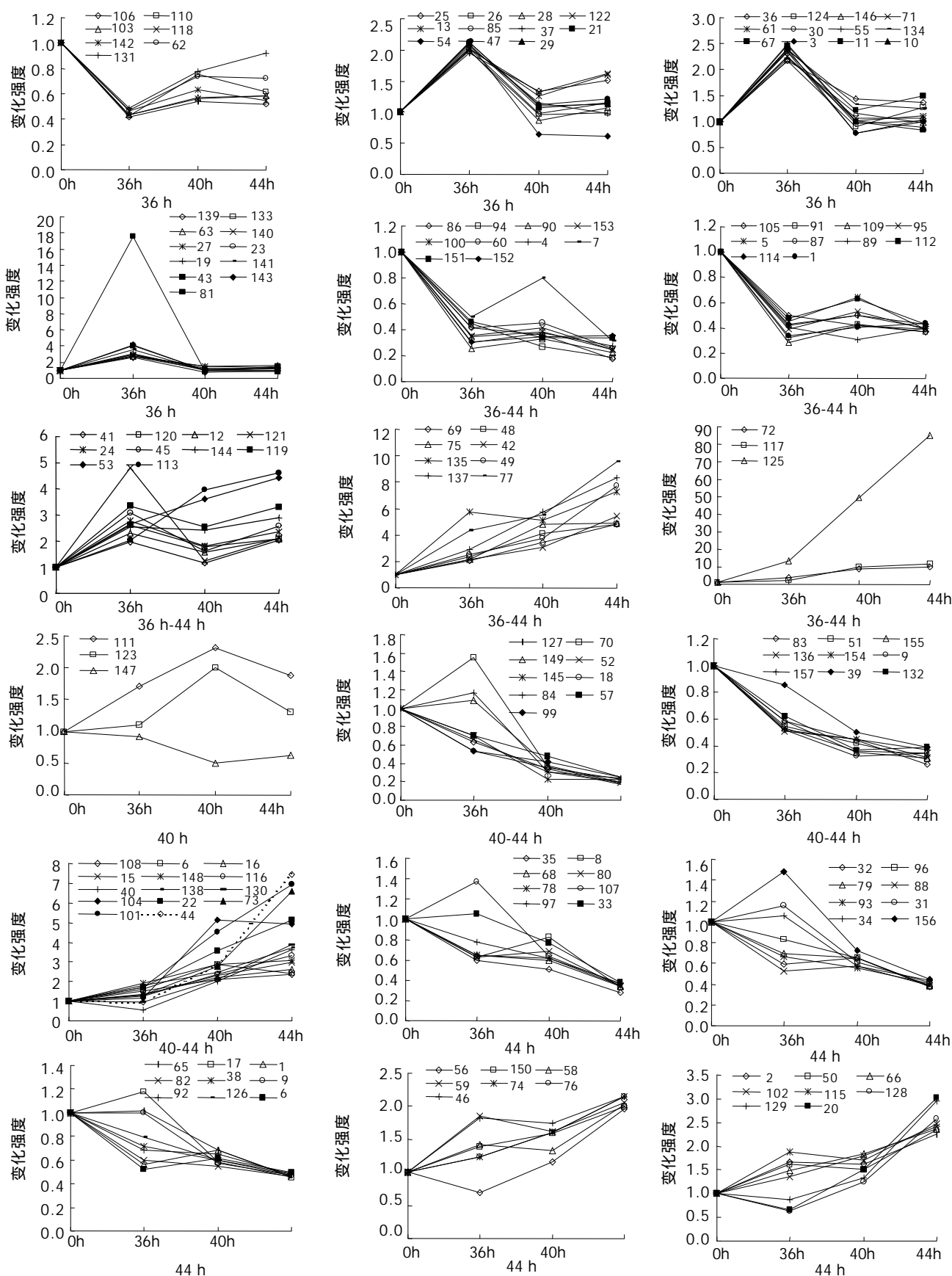


图4 0-36-40-44 h SISPH 中基因的表达动态.

2.4 SISPH 与 PH 中基因表达的比较 与 PH 相比, 38 个基因在 SISPH 中特异性表达(表 1 中 * 标出), 119 个

基因在两个模型中均有表达, 他们在两个模型中的表达趋势相似, 但在相同时间点的表达丰度不同(表 2).

表 2 SISPH 和 PH 的基因表达情况比较

名称	差异值		名称	差异值	
	SISPH	PH		SISPH	PH
未报道的基因					
AW558171	0.3	0.3	细胞色素 P450 2E1 (Cyp 2E1)	0.2	0.1
CG31759-PA	2.2	2.9	细胞色素 P450 花生四烯酸环氧化酶 (Cyp 2C23)	0.3	0.2
CH230-186B23	0.3	0.2	细胞色素 P450, 2c39 (Cyp2c39)	0.5	0.1
CH230-206C20	0.4	0.2	含黄素的单加氧酶 1 (Fmo1)	0.2	0.1
CH230-329D3	2.8	2.0	对氧磷酶 1 (Pon1)	0.4	0.2
CH230-372C24	0.3	0.1	过氧化物酶体肌氨酸氧化酶 (PSO)	0.4	0.3
CH230-7A22	0.3	0.1	参与生物调节的蛋白		
Citb585c7	0.3	0.2	含 34 肽重复序列的蛋白 II	0.5	0.2
FLJ20356	2.5	2.5	糖蛋白		
LOC119392	2.3	2.1	α -1-B 糖蛋白 (A1bg),	0.2	0.1
LRRP Aa2-020	0.5	0.4	纤维蛋白原 γ (Fgg)	6.9	5.1
LRRP Ab1-021	3.0	6.3	纤连蛋白 1 (Fn1)	2.4	7.2
LRRP Aa2-028	2.6	2.1	富含组氨酸的糖蛋白 (Hrg)	0.4	0.1
LRRP Aa2-174	0.2	0.1	鞘磷脂相关的糖蛋白 (L-MAG)	5.1	7.0
LRRP Aa2-296	3.1	2.1	UDP-葡萄糖醛酸基粘蛋白	0.4	0.3
LRRP Ab1-114	3.0	4.2	脂蛋白		
LRRP Ab1-216	5.2	6.8	载脂蛋白 C-I (Apoc1)	0.4	0.3
LRRP Ab1-331	3.0	2.2	可溶性载体家族 20, 成员 1 (Slc20a1)	0.4	0.4
LRRP Ab1-334	2.8	2.7	甲状腺素运载蛋白-related protein (TTN)	0.3	0.3
LRRP Ab2-008	2.0	2.1	核蛋白		
LRRP Ab2-034	3.0	2.3	RNA 酶 A 家族 4	0.4	0.2
LRRP Ab2-095	2.3	3.1	各种因子		
LRRP Ab2-225	0.4	0.3	血管生成素	0.4	0.2
LRRP Ab2-232	0.4	0.2	真核生物翻译起始因子 4A1	2.5	3.8
LRRP Ab2-371	0.3	0.4	B 细胞前体集落增强因子 (Pbef)	3.3	3.4
LRRP Ab2-379	2.2	2.2	与免疫有关的蛋白		
LRRP Ab2-417	0.4	0.2	补体成分 5 (C5)	11.8	8.8
LRRP Ac1177	3.6	3.3	I 免疫球蛋白 C- κ	0.4	0.2
LRRP Ac1233	2.1	4.2	巨噬细胞趋化因子 (JE/MCP)	3.3	4.0
LRRP Ac1873	5.4	6.0	细胞骨架蛋白		
LRRP Ac2-019	4.1	2.0	肌动蛋白 γ	2.6	4.7
LRRP Ac2-061	7.4	7.6	网格蛋白重链 (Hc)	2.0	3.3
LRRP Ac2-143	3.1	3.3	标记蛋白		
LRRP Ac2-193	2.1	2.3	血浆淀粉样蛋白 a-5	84.8	90.5
LRRP Ac2-223	2.1	2.4	抑制性亚染色体转移片段 4	0.5	0.3, 2.3
LRRP Ba1-647	4.9	3.2	受体蛋白		
LRRP Bm403207	7.7	5.7	ATP-结合框亚家族 C	0.2	0.2
LRRP Cb1-739	2.4	2.3	细胞核受体超家族 0, 成员 2 (Nr0b2)	0.4	0.2
LRRP Cc1-27	0.3	0.1, 2.2	I 型白介素 1 受体 (Il1r1)	4.6	7.9
LRRP Cc1-38	0.2	0.2	参与氨基酸代谢的酶		
LRRP Cc1-9	4.4	2.5	精氨酸酶 1 (Arg1)	2.6	3.5
LRRP zbs559	2.0	3.1	精氨酸琥珀酸裂解酶 (Asl)	2.9	4.9
LRRPAb2-132	0.3	0.1	2-酪氨酸辅酶 A 裂解酶(Hpcl2)	0.4	0.4
RIKEN 1110061A24	2.0	3.0	蛋白水解酶		
RIKEN 1300002A08	0.3	2.4	半胱氨酸蛋白酶 1 (Casp1)	2.4	2.6
RP11-281N10	0.5	0.3	蛋白酶抑制因子		
RP23-195K1	2.7	2.4	α -2-巨球蛋白 (A2m)	7.3	21.3
RP23-235O1	0.5	0.2	α -胰蛋白酶抑制因子重链 4	0.3	0.2
RP23-417P22	0.5	0.1	依赖 Ca ²⁺ 的蛋白水解酶抑制因子	8.3	6.6
RP23-92K11	2.4	2.7	丝氨酸蛋白水解酶抑制因子 1	3.7	5.0
RP32-28p17	0.3	0.3	磷酸化酶		
DNA segment of Chr 1	4.8	6.1	胸苷酸激酶	2.8	3.0
Adult male mouse liver cDNA	0.2	0.1	促黏液蛋白 4	3.6	2.1
参与应急反应的蛋白			磷酸酶		
α -1 主要急相蛋白	9.8	6.2	磷脂酰丝氨酸磷脂酶 A1	2.9	2.8
血管紧张肽原 (Agt)	6.6	8.4	UTP-葡萄糖-1-磷酸酶	0.5	0.4
激肽原	4.9	3.4	合成酶基		
Petaxin	2.1	2.2	谷氨酰脯氨酰-tRNA 合成酶 (Eprs)	3.1	4.5
T-激肽原	9.6	5.9	脂肪酸烯醇化酶 1 (rELO1)	0.2	0.2
参与糖类代谢的酶			转移酶		
乙醇脱氢酶 (ADH)	0.4	0.1, 2.4	谷胱甘肽巯基转移酶 Y(b) 亚基	0.3	0.3, 2.0
甘油 3-磷酸脱氢酶 (Gpd3)	0.4	0.4	肉碱 O-辛酰转移酶 (Crot)	0.3	0.3
异柠檬酸脱氢酶 1 (Idh1)	0.3	0.3	谷胱甘肽巯基转移酶 α -1 (Gsta1)	0.2	0.1
参与脂肪或类固醇代谢的酶			3 型谷胱甘肽巯基转移酶, (Yb3) (Gstm3)	0.3	0.3
丙二酰辅酶 A 脱羧酶	0.5	0.3	磺基转移酶 K2	0.3	0.3
NAD (P) 依赖的脱羧酶	0.3	0.4	噻唑转移酶 1 (Siat1)	0.4	2.6
细胞色素 P450 胆固醇 7- α 羟化酶 (P450 VII)	0.2	0.4, 2.3	UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 2, 成员 5 (Ugt2b5)	0.4	0.3
前列腺素 D2 合成酶 2 (Ptgds2)	2.0	3.0			
3- α 羟类固醇脱氢酶	0.2	0.2			
参与氧化还原反应的蛋白					
细胞色素 b5 (Cyb5)	0.4	0.2			
细胞色素 P450	0.4	0.2			
细胞色素 P450 3A1 (PNCN, Cyp 3A1)	0.3	0.2			

制, 中期抑制, 晚期抑制(图3).

2.5 SISPH 中基因表达的丰度差异 在 0-36-40-44 h SISPH 中, 不同基因的变化幅度不同, 根据上调或下调的幅度, 可以将这些基因分为 3 类: (1)70 个基因下调超过 0.5; (2)84 个基因上调在 2-10 之间; (3)3 个基因上调达 10 以上(图 5).

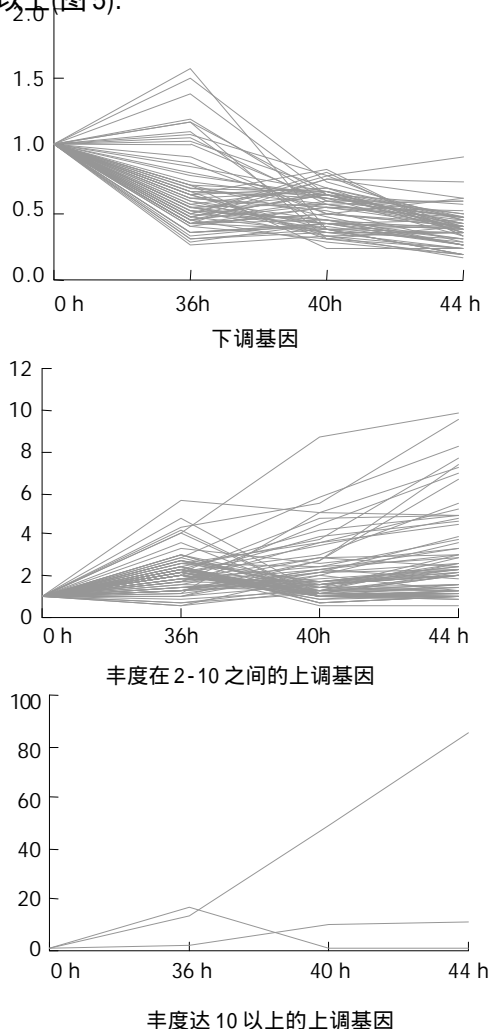


图 5 0-36-40-44 h SISPH 中基因表达丰度.

3 讨论

3.1 肝再生过程中上调表达的基因 41 个基因在 SISPH 的 36 h 达到表达高峰, 表明这些基因可能与肝再生的细胞分裂和增生有关. 其中, 前列腺素 D2 合成酶 2 可催化前列腺素 D2 的合成和转运类维生素 A^[31], 他的上调表达意味着这两类维生素在肝再生中起重要作用. 巨噬细胞趋化因子(JE/MCP1)是多种炎症反应和免疫反应的抑制剂^[32], 他的大量表达可能与减少部分肝切除引起的炎症反应有关. 网格蛋白可以合成或捕获内吞囊泡并定位于高尔基体的反面膜^[33], 他的大量表达表明细胞内运输和消化活跃. CD44 是结合在透明质酸上的一类跨膜糖蛋白, 他的上调可能与新生肝细胞的粘连有关^[34]. 胸苷激酶为 dTTP、氨酰化嘧啶和氨基酸合成所必须, 他在 SISPH 的 36 h 大量表达, 说明这个时期的核苷酸和蛋

白质合成很旺盛. Mss4 蛋白是一个细胞核磷蛋白^[35-36], 他调节 Ras 信号途径, 因此他的大量表达可能是通过该信号途径抑制肝细胞的凋亡. 作为细胞周期蛋白, CDK 103 的大量表达可能促进肝细胞的大量分裂. α -2 巨球蛋白是新生肝细胞产生的一种蛋白水解酶抑制因子^[36], 他的上调表达意味着肝再生中细胞的异化作用受到抑制. Fc- γ 受体 III 能促进巨噬细胞炎症蛋白 1- α 的合成^[37]和导致依赖 IgG 的细胞毒性及多种细胞因子和化学因子的产生^[38-39], 故他的大量表达可能与肝切除后的多种免疫反应或炎症反应有关. 肌动蛋白 γ 能参与细胞分裂过程中细胞质的组织结构^[40], 他的上调表达表明他与肝再生的细胞结构和功能建成有关. 鞘磷脂糖蛋白、可可蛋白、突变型肌动蛋白 β 和一个尚未报道过的蛋白基因在 SISPH 的 40 h 达到表达高峰, 鞘磷脂糖蛋白对神经系统的重建具有重要作用^[41], 他可能参与肝脏神经系统的再生. 可可蛋白可以防止早期乙醇诱导的肝损伤^[42], 他的上调表达可能有助于保护再生肝不受醇类的伤害. α -1 主要急相蛋白属半胱氨酸蛋白水解酶抑制因子, 补体成分 5 不仅诱导肝细胞分泌葡萄糖, 还参与急相免疫反应的启动^[43], 他们的共同作用可能有助于再生肝的血液循环和炎症消除. 血浆淀粉样蛋白 A5 基因上调达 85, 推测他能参与损伤蛋白及其他无用成分的聚集. 依赖 Ca^{2+} 的丝氨酸蛋白水解酶抑制因子参与蛋白糖基化并促进其成熟^[44], 他在该时期的过量表达有助于细胞粘连. 磷脂酰丝氨酸磷脂酶 A1 能参与磷脂水解成 2-酰基溶血磷脂和抑制溶血磷脂的合成^[45-46], 他的上调表达可能与肝再生中的脂质转化有关. 具有血管活性的血管紧张肽^[47-49]的大量表达可能有利于改善肝脏的血液循环, 加快肝再生的进程. B 细胞前体集落增强因子是造血细胞的分裂素, 他在 SISPH 的 44h 剧烈表达可能有助于肝细胞通过 G₁ 检验点进行 DNA 复制和肝细胞增生^[26]. 纤维蛋白原 γ 是 II 型急相反应蛋白中的一类, 促进血小板的凝集和纤粘连斑的形成, 并对手术损伤(如肝切除等)产生非特异性的急相反应^[50-52], 他的上调表达与肝切除后的急相反应有关. 天冬氨酸转氨酶是嘌呤碱合成所必需的, 他的上调说明细胞需要大量嘌呤. 丝氨酸蛋白酶抑制因子 1 是丝氨酸蛋白酶抑制因子超家族中的一种, 可能具有中和肝切除产生的炎症反应作用. 纤连蛋白 1 参与诱导细胞的有丝分裂并能形成细胞外基质的纤维网络复合物^[53-55], 因此, 他的上调表达可能会加快残肝细胞的分裂, 从而促进细胞的结构功能建成和残肝的再生. 精氨酸琥珀酸裂解酶是鸟氨酸循环中的限速酶, 同时, 他催化精氨酸的生物合成^[56-58], 另外, 他防止肝脏的纤维化损伤, 他的上调表达在肝再生中也起着积极的作用.

3.2 肝再生过程中下调表达的基因 12 个基因在 SISPH 的 36 h 表达达到最少, 表明这些基因可能与增生抑制有关. 其中, 富含组氨酸的糖蛋白能抑制肝磷脂的抗凝血酶活性^[59-61], 他的下调表达有助于再生肝的血液循

环. 载脂蛋白 C-I 是脂蛋白与 LDL 受体和 VLDL 受体结合的抑制因子, 也是血浆胆固醇脂转运蛋白的抑制因子^[62], 他的下调可能更有利于肝再生所需要的脂类转运. 苯丙氨酸羟化酶能催化苯丙氨酸转变为酪氨酸^[63], 为再生肝提供合成蛋白质所必须氨基酸. 甲状腺素运载蛋白参与嘌呤的分解代谢^[64], 他的下调表达表明, 这个时期再生肝可能需要更多的嘌呤. 血管生成素与血管发育有关, 是新血管形成的主要因子之一^[65], 他的下调表达说明这个时期血管生成较少. 肉毒碱 O- 辛酰转移酶能协助中链或长链脂肪酸进出过氧化物酶体和线粒体^[66], 他的下调表达说明, 这个时期的再生肝的饱和脂肪酸的代谢较弱. 细胞色素 P450 花生四烯酸环氧化酶、肉毒碱 O- 辛酰转移酶等都是与再生肝的脂代谢有关, 他们的下调表达表明, 在 SISPH 的 36 h, 残肝的脂代谢很弱. 7 个基因在 SISPH 的 40 h 下调表达至最低点, 其中, 与氧化还原及降解外源毒素和内源雌激素等^[67]有关的酶 2- 酪氨酸辅酶 A 裂解酶、细胞色素 P450 3A1 (Cyp 3A1)、谷胱甘肽巯基转移酶 Y (b) 等的下调表达可能有助于保护残肝免受氧化作用的毒害. 磷酸酶 1 催化微管蛋白羧基酶与微管的缔合作用, 进而促进微管蛋白的降解^[68], 他的下调暗示这个时期的肝细胞需要大量合成微管蛋白. 谷胱甘肽巯基转移酶能清除外源致癌物, 同时他还具有抗氧化作用^[69], 他的下调可能有助于保持再生肝的谷胱甘肽高水平. 在 SISPH 的 44h 表达量最少的 52 个基因中, 与脂代谢有关的酶如异柠檬酸脱氢酶 1、丙二酰辅酶 A 脱羧酶 (MCD)、可溶性载体家族 20、唾液酸转移酶 1、细胞色素 P450 胆固醇 7- α 羟化酶、NAD (P) 依赖的类固醇脱氢酶、3- α 羟类固醇脱氢酶等的下调表明, 残肝的脂代谢仍然很弱^[70-72]. 亚胺对肝细胞有毒性, 与亚胺合成有关的异柠檬酸脱氢酶 1 在再生肝中的下调表达有助于肝再生的进行. 乙醇脱氢酶的下调表达说明肝再生中乙醇代谢途径受到了抑制. 肌氨酸氧化酶参与线粒体氧化磷酸化的电子传递, 他的下调表明这个时期再生肝的氧化磷酸化作用较弱. 细胞色素 P450 胆固醇 7- α 羟化酶在保持肝脏的胆固醇水平方面起重要作用^[73], 他的下调表达表明再生肝的胆固醇合成较弱. ATP 结合框亚家族 C 与异质蛋白由内质网运输到高尔基体有关^[74], 他的下调表达表明, 再生肝很少合成异质蛋白. 3- α 羟类固醇脱氢酶参与胆汁酸的生物合成^[75], 他的下调表明再生肝的分化程度较低. α -1-B 糖蛋白能刺激血小板的分泌和积聚^[76], 他的下调表达可能有助于再生肝的血液循环. 与氧化还原有关的酶如细胞色素 P450 (Cyp), 细胞色素 P450 2b19 (Cyp 2b19), 细胞色素 P450 2c39 (Cyp 2c39), 细胞色素 B5, 黄素单加氧酶, 细胞色素 P450 2E1 (Cyp 2E1), 对氧磷酶等^[77]的下调表达可能有助于保护残肝免受氧化作用的毒害. 总之, 肝再生是个复杂的过程, 涉及到许许多多基因和蛋白质及他们的协同作用, 应该进一步的深入研究.

致谢: 感谢上海博星生物基因芯片有限责任公司的帮助.

4 参考文献

- Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Moint* 2002;8:RA53-63
- Li YC, Xu CS, Zhu WL, Li WQ. Isolation and analysis of a novel gene over-expressed during liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2003;9:1282-1286
- Xu CS, Li YC, Lin JT, Zhang YH. Cloning and analysing the up-regulated expression of transthyretin-related gene (LR1) in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2003;9:148-151
- Debonera F, Krasinkas AM, Gelman AE, Aldegue X, Que X, Shaked A, Olthoff KM. Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation. *Hepatology* 2003;38:1563-1572
- Gandillet A, Alexandre E, Royer C, Cinqualbre J, Jaeck D, Richert L. Hepatocyte ploidy in regenerating livers after partial hepatectomy, drug-induced necrosis, and cirrhosis. *Eur Surg Res* 2003;35:148-160
- Xu CS, Lu AL, Feng QC, Li GW. Effects of short interval successive partial hepatectomy on ACP, AKP, HSC70/HSP68 and PCNA in rat liver. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2001;34:197-206
- Qin JM, Fu XY, Li SJ, Liu SQ, Zeng JZ, Qiu XH, Wu MC, Wang HY. Gene and protein expressions of p28GANK in rat with liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2003;9:2523-2527
- Xu CS, Lu AL, Xia M, Li XY, Li YH, Zhao XY. The effect of heat shock before rat partial hepatectomy on HSC70/HSP68 expression and phosphatase activities. *Shiyan Shengwu Xuebao* 2000;33:1-11
- 龚作炯, 吴亚斌, 杨丽华. 生长激素和肝细胞生长因子对大鼠肝大部切除后再生的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1905-1908
- 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除后肝细胞生长周期的调控. *世界华人消化杂志* 2003;11:1152-1155
- Xia M, Xu C, Ji S, Xue S. Shedding of Fas ectodomain that affects apoptosis of hepatocytes occurring in regenerative liver. *J Gastroenterol* 2002;37:1042-1047
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 2003;120:117-130
- Xia M, Xue SB, Xu CS. Shedding of TNFR1 in regenerative liver can be induced with TNF alpha and PMA. *World J Gastroenterol* 2002;8:1129-1133
- Schoen JM, Lauth WW. Nitric oxide potentiates C-Fos mRNA expression after 2/3 partial hepatectomy. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:47-48
- Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X. The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* 2002;37:606-612
- 陈平, 李昆, 董家鸿, 韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化. *世界华人消化杂志* 2003;11:434-437
- Papalampros E, Felekouras ES, Filis K, Angelopoulou R, Kourelis T, Tsamandas AC, Bastounis E. Liver pathology and cell proliferation after octreotide administration following partial hepatectomy in rats: an experimental study. *Dig Dis Sci* 2002;47:1953-1958
- Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF- α /IL-6 dependent mechanism. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):812-818
- Kong D, Kusano M, Arase T, Nishino N, Jin Z, Kameyama S, Kato H, Niiya T, Fujioka T, Murakami M, Itoh Y. Liver regeneration after portal vein plus hepatic artery ligation performed heterochronously in rats. *Hepatobiliary J Pancreat Surg* 2002;9:86-92
- Picard C, Lambotte L, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Van den Berge V, Horsmans Y. Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2002;36:645-652

- 21 Xu M, Han B, Xue L, Gong J. Ursodeoxycholic acid promotes liver regeneration after partial hepatectomy in bile duct obstructive rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:103-105
- 22 Xu WX, Wang SY, Wei HD, Yang XM. Isolation of regulation genes related with liver regeneration by representational difference analysis. *Shengli Xuebao* 2000;52:277-280
- 23 Yamano T, Hirai R, Hato S, Uemura T, Shimizu N. Delayed liver regeneration with negative regulation of hepatocyte growth factor and positive regulation of transforming growth factor-beta1 mRNA after portal branch ligation in biliary obstructed rats. *Surgery* 2002;131:163-171
- 24 Alhonen L, Rasanen TL, Sinervirta R, Parkkinen JJ, Korhonen VP, Pietila M, Janne J. Finland. Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration. *Biochem J* 2002;362(Pt 1):149-153
- 25 Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, Katsuma S, Shiojinma S, Yamada M, Okuyama T, Suzuki S, Tsujimoto G. Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:784-792
- 26 Li YC, Lin JT, Li WQ, Zhang HY, Wei MX, Xu CS. Cloning and functional analysis of up-regulated expressed genes in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *Devel Reproductive Biol* 2002;11:151-160
- 27 Li YC, Ma ZQ, Xu CS. Change of TNF- β , c-myc, p53, p21, PCNA, Bcl-2, TGF- β related with the cell preolification in rat liver regeneration following short interval successive partial hepatectomy. *Devel Reproductive Biol* 2002;11:253-260
- 28 Jensen SA. Liver gene regulation in rats following both 70 or 90% hepatectomy and endotoxin treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:525-530
- 29 徐存拴, 李永辉, 段瑞峰, 卢爱灵, 夏民, 吉爱玲. 短间隔连续部分肝切除对大鼠生存和肝组织结构的影响. *动物学报* 2001;47:659-665
- 30 段瑞峰, 吕静峰, 张冬芬, 夏民, 徐存拴. 短间隔连续部分肝切除 (SISPH) 对肝细胞核和核仁的影响. *动物学报* 2001;47:199-206
- 31 Tzanakakis GN, Krambovitis E, Tsatsakis AM, Vezeridis MP. The preventive effect of ketoconazole on experimental metastasis from a human pancreatic carcinoma may be related to its effect on prostaglandin synthesis. *Int J Gastrointest Cancer* 2002;32:23-30
- 32 Awahara RS, Deng ZW, Denking DJ, Deuel TF. Role of serine/threonine protein kinases in the induction of JE, a platelet-derived growth factor inducible gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1815-1820
- 33 Wu XF, Zhao XH. Greene clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2001;155:291-300
- 34 Della Fazio MA, Pettirossi V, Ayroldi E, Riccardi C, Magni MV, Servillo G. Differential expression of CD44 isoforms during liver regeneration in rats. *J Hepatol* 2001;34:555-561
- 35 Audhya A, Emr SD. Regulation of PI4, 5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 2003;22:4223-4236
- 36 Audhya A, Emr SD. Regulation of PI4, 5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* 2003;22:4223-4236
- 37 Hope C, Mettenburg J, Gonias SL, DeKosky ST, Kamboh MI, Chu CT. Functional analysis of plasma alpha(2)-macroglobulin from Alzheimer's disease patients with the A2M intronic deletion. *Neurobiol Dis* 2003;14:504-512
- 38 Song XY, Shapiro S, Goldman DL, Casadevall A, Scharff M, Lee SC. Fc γ Receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1alpha induction in primary human and murine microglia. *Infect Immun* 2002;70:5177-5184
- 39 Arase N, Arase H, Hirano S, Yokosuka T, Sakurai D, Saito T. IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII. *J Immunol* 2003;170:3054-3058
- 40 Ducret A, Nguyen M, Breckenridge DG, Shore GC. The resident endoplasmic reticulum protein, BAP31, associates with gamma-actin and myosin B heavy chain. *Eur J Biochem* 2003;270:342-349
- 41 Ito H, Ishida H, Collins BE, Fromholt SE, Schnaar RL, Kiso M. Systematic synthesis and MAG-binding activity of novel sulfated GM1b analogues as mimics of Chol-1 (alpha-series) gangliosides: highly active ligands for neural siglecs. *Carbohydr Res* 2003;338:1621-1639
- 42 McKim SE, Konno A, Gabele E, Uesugi T, Froh M, Sies H, Thurman RG, Arteel GE. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 2002;406:40-46
- 43 Mack C, Jungermann K, Gotze O, Schieferdecker HL. Anaphylatoxin C5a actions in rat liver: synergistic enhancement by C5a of lipopolysaccharide-dependent alpha (2)-macroglobulin gene expression in hepatocytes via IL-6 release from Kupffer cells. *J Immunol* 2001;167:3972-3979
- 44 Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G. Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L412-L417
- 45 Wen XY, Stewart AK, Skaug J, Wei E, Tsui LC. Murine phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (Ps-pla1) maps to chromosome 16 but is distinct from the lpd (lipid defect) locus. *Mamm Genome* 2001;12:129-132
- 46 Aoki J, Nagai Y, Hosono H, Inoue K, Arai H. Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:26-32
- 47 Grammatopoulos TN, Morris K, Bachar C, Moore S, Andres R, Weyhenmeyer JA. Angiotensin II attenuates chemical hypoxia-induced caspase-3 activation in primary cortical neuronal cultures. *Brain Res Bull* 2004;62:297-303
- 48 Zhang Y, Yang X, Wu P, Xu L, Liao G, Yang G. Expression of angiotensin II type 1 receptor in rat hepatic stellate cells and its effects on cell growth and collagen production. *Horm Res* 2003;60:105-110
- 49 Carvalho TH, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 2003;42:707-712
- 50 Mosesson MW. Fibrinogen gamma chain functions. *J Thromb Haemost* 2003;1:231-238
- 51 Yakovlev S, Loukinov D, Medved L. Structural and functional role of the beta-strand insert (gamma 381-390) in the fibrinogen gamma-module. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:122-124
- 52 Gerner C, Steinkellner W, Holzmann K, Gsur A, Grimm R, Ensinger C, Obrist P, Saueremann G. Elevated plasma levels of crosslinked fibrinogen gamma-chain dimer indicate cancer-related fibrin deposition and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2001;85:494-501
- 53 Ni H, Papalia JM, Degen JL, Wagner DD. Control of thrombus embolization and fibronectin internalization by integrin alpha IIb beta 3 engagement of the fibrinogen gamma chain. *Blood* 2003;102:3609-3614
- 54 Gao M, Craig D, Lequin O, Campbell ID, Vogel V, Schulten K. Structure and functional significance of mechanically unfolded fibronectin type III1 intermediates. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:14784-14789
- 55 Nishizawa Y, Fukai F, Natori Y, Kato R, Tanuma S, Katayama T. Mesangial cell apoptosis induced by a fibronectin fragment. *Apoptosis* 1998;3:407-412
- 56 Mori T, Nagai K, Mori M, Nagao M, Imamura M, Iijima M, Kobayashi K. Progressive liver fibrosis in late-onset argininosuccinate lyase deficiency. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:597-601
- 57 Yu B, Howell PL. Intragenic complementation and the structure and function of argininosuccinate lyase. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1637-1651
- 58 Masaki IM, Shoji TK, Toda YH, Totani MY. Liver-type arginase is a highly sensitive marker for hepatocellular damage in rats. *Clin Chem* 2001;47:946-948

- 59 Mori S, Takahashi HK, Yamaoka K, Okamoto M, Nishibori M. High affinity binding of serum histidine-rich glycoprotein to nickel-nitrilotriacetic acid: the application to microquantification. *Life Sci* 2003;73:93-102
- 60 Gorgani NN, Smith BA, Kono DH, Theofilopoulos AN. Histidine-rich glycoprotein binds to DNA and Fc gamma RI and potentiates the ingestion of apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2002;169:4745-4751
- 61 Fu CL, Horn MK 3rd. Histidine-rich glycoprotein plus zinc to neutralize heparin. *J Lab Clin Med* 2002;139:211-217
- 62 Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:297-304
- 63 Doskeland AP, Flatmark T. Conjugation of phenylalanine hydroxylase with polyubiquitin chains catalysed by rat liver enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2001;1547:379-386
- 64 Eneqvist T, Lundberg E, Nilsson L, Abagyan R, Sauer-Eriksson AE. The transthyretin-related protein family. *Eur J Biochem* 2003;270:518-532
- 65 Hisai H, Kato J, Kobune M, Murakami T, Miyanishi K, Takahashi M, Yoshizaki N, Takimoto R, Terui T, Niitsu Y. Increased expression of angiogenin in hepatocellular carcinoma in correlation with tumor vascularity. *Clin Cancer Res* 2003;9:4852-4859
- 66 Morillas M, Gomez-Puertas P, Rubi B, Clotet J, Arino J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G. Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem* 2002;277:11473-11480
- 67 Galant C, Gala JL, Van Den Berge V, Berliere M, Haumont E, Horsmans Y. Immunolocalisation of cytochrome P-450 3A enzymes in human breast carcinoma: relationship with tumour differentiation and steroid receptors. *Pharmacol Toxicol* 2001;88:142-146
- 68 Contin MA, Purro SA, Bisig CG, Barra HS, Arce CA. Inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A decrease the level of tubulin carboxypeptidase activity associated with microtubules. *Eur J Biochem* 2003;270:4921-4929
- 69 Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Nakajima J, Teramoto S, Ouchi Y, Matsuse T. Depletion of glutathione S-transferase P1 induces apoptosis in human lung fibroblasts. *Exp Lung Res* 2003;29:523-536
- 70 Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 2003;378(Pt 3):938-990
- 71 Kerner J, Hoppel CL. Radiochemical malonyl-CoA decarboxylase assay: activity and subcellular distribution in heart and skeletal muscle. *Anal Biochem* 2002;306:283-289
- 72 Lee GY, Kim NH, Zhao ZS, Cha BS, Kim YS. Peroxisomal proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the rat hepatic malonyl-CoA decarboxylase gene; A key regulation of malonyl-CoA level. *Biochem J* 2003;Pt
- 73 Davis RA, Miyake JH, Hui TY, Spann NJ. Regulation of cholesterol-7 α -hydroxylase: BAREly missing a SHP. *J Lipid Research* 2002;43:533-543
- 74 Tate G, Li M, Suzuki T, Mitsuya T. A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet Syst* 2002;77:117-121
- 75 Espey LL, Yoshioka S, Ujioka T, Fujii S, Richards JS. 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA transcription in the immature rat ovary in response to an ovulatory dose of gonadotropin. *Biol Reprod* 2001;65:72-78
- 76 Adam F, Verbeuren TJ, Fauchere JL, Guillin MC, Jandrot-Perrus M. Thrombin-induced platelet PAR4 activation: role of glycoprotein Ib and ADP. *J Thromb Haemost* 2003;1:798-804
- 77 Chanas B, Wang H, Ghanayem BI. Differential metabolism of acrylonitrile to cyanide is responsible for the greater sensitivity of male vs female mice: role of CYP2E1 and epoxide hydrolases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;193:293-302